

## FISCH ALS LEBENSMITTEL

### Enzymatische Verfahren zur Unterscheidung gefrosteter/aufgetauter Filets von Naßfischfilets

Seegefrostete/aufgetaute Filets werden häufig in Fischgeschäften, besonders in Zeiten reduzierten Naßfischangebotes, auf Eis liegend wie "Frischfischfilet" verkauft. Die aufgetauten Filets sind nicht immer entsprechend deklariert, so daß der Kunde über die Herkunft der Ware oft im unklaren ist. Aufgetaute Filets können sich jedoch von Naßfischfilets u. a. in folgenden Eigenschaften unterscheiden (1) :

- sie besitzen eine festere, z. T. strohige, trockene Konsistenz,
- nach mehrtägiger Eislagerung findet kein ammoniakalischer Verderb statt, sondern aufgetaute Filets entwickeln einen säuerlichen, bitteren Geschmack.

Je nach Frischegrad der Naßfischfilets und Tiefkühlagerzeit der aufgetauten Filets sind diese Unterschiede zwischen beiden Filetsorten mehr oder weniger stark ausgeprägt.

Vor diesem Hintergrund ist eine Kennzeichnungspflicht für Auftauware erwägenswert (2, 3).

Bisher jedoch fehlte den Institutionen der Lebensmittelüberwachung eine objektive Methode zur zweifelsfreien Identifizierung aufgetauter Filets. Aus diesem Grunde wurde ein enzymatisches Verfahren entwickelt, das zuverlässige Aussagen über die Vorgeschichte eines Filets erlaubt (4). Es basiert auf der durch Gefrier- und Auftauprozesse bewirkten Freisetzung lysosomaler Enzyme. Als Lysosomen bezeichnet man Zellorganellen <sup>x)</sup>, die Enzyme (Hydrolasen) mit einem Aktivitätsmaximum im sauren pH-Bereich enthalten.

Die Aktivität dieser lysosomalen Enzyme ist in durch Zentrifugation gewonnenen Preßsäften aus aufgetauten Filets deutlich höher als in Preßsäften aus Naßfischfilets. Um, u. a. durch biologische Einflüsse hervorgerufene, Schwankungen des gesamten Enzymgehaltes (Summe von freier und lysosomen-gebundener Aktivi-

---

x) Unter Zellorganellen versteht man strukturelle Elemente, die innerhalb der einzelnen Zellen eine weitere Unterteilung und Abgrenzung ihrer Inhaltsstoffe und damit auch eine räumliche Trennung einzelner Funktionen erlauben.

tät) auszugleichen, wurden die Enzymaktivitäten nicht nur in Preßsäften, sondern auch in den Extrakten aus den zugehörigen Sedimenten ermittelt. Der Quotient aus den spezifischen Enzymaktivitäten in Filetpreßsaft und dazugehörigem Extrakt, das sogenannte "Aktivitätsverhältnis", weist für Naßfischfilets und aufgetaute Filets jeweils charakteristische Werte auf (Tabelle 1) (4).

Tabelle 1: Aktivitätsverhältnisse von Seefischfilets

Filetart	Aktivitätsverhältnis		Enzym
	frische Filets	aufgetaute Filets	
Kabeljau/Dorsch	0,05 - 0,20	0,50 - 1,20	$\alpha$ -Glucosidase EC 3.2.1.20
Seelachs	0,06 - 0,20	0,50 - 1,20	
Rotbarsch	0,15 - 0,40	0,50 - 1,50	$\beta$ -N-Acetylglucosaminidase
Schellfisch	0,10 - 0,25	0,60 - 1,30	EC 3.2.1.30

Die Eignung des Verfahrens wurde durch die Untersuchung mehrerer hundert Filets erwiesen. Als nachteilig ist jedoch der relativ große Zeitaufwand zu bewerten: die Prüfung von beispielsweise 4 Filets erfordert 6 bis 8 Stunden Arbeitszeit; sie umfaßt die Herstellung von Preßsäften und Extrakten sowie die Bestimmung der Enzymaktivitäten und Eiweißgehalte in diesen Lösungen. Um die Untersuchungen zu vereinfachen, wurde das Verfahren daraufhin modifiziert. Bei Vorversuchen hatte sich herausgestellt, daß zweimaliges Gefrieren eines Filets nur zu einer geringfügigen weiteren Steigerung der Enzymaktivität im Preßsaft führte. Seegefrostete/aufgetaute Filets sollten daher - im Gegensatz zu Naßfischfilets - nach Einfrieren und Auftauen im Labor keine wesentliche Zunahme der Enzymaktivität im Preßsaft aufweisen. Da bei dieser Methode 2 Preßsäfte eines Filets verglichen werden, stören Variationen des Gesamtzymgehaltes der Filets nicht.

Es wurde nach folgender Arbeitsvorschrift verfahren:

### 1. Gefrieren der Filets

Das zu untersuchende Filet wird senkrecht zur Längsachse halbiert; der vordere Filetteil wird über Nacht im Polybeutel eingefroren (bei -20 bis -25°C im Gefrierfach), der hintere Filetteil im Polybeutel im Kühlschrank aufbewahrt.

### 2. Herstellung der Preßsäfte

Am nächsten Tag wird der gefrorene Filetteil im Polybeutel mit Leitungswasser aufgetaut.

Zur Preßsafterstellung werden pro Filetteil 20 g weiße Muskulatur hochtourig zentrifugiert: z.B. in der Kühlzentrifuge MSE 18, Rotor No. 69 182, mit einer Drehzahl von 18 000 Upm (= 38 000 x g) bei 30minütiger Laufzeit und 5°C.

Die Preßsaftausbeute wird in g Preßsaft/100 g Muskulatur angegeben.

### 3. Enzymtests

- Bei Filets von Kabeljau/Dorsch und Seelachs wird die Aktivität der  $\alpha$ -Glucosidase bestimmt, wobei im Prinzip die Freisetzung von p-Nitrophenol aus p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid photometrisch bei der Wellenlänge 405 nm gemessen wird.

Der Testansatz enthält folgende Lösungen:

0,20 ml p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid, 25 mM in dest. Wasser, 0,20 ml Kaliumcitrat-Puffer, 0,20 M, pH 4,5, 0,30 ml NaCl, 1 M, Preßsaft und die zur Einstellung eines Gesamtvolumens von 1,20 ml nötige Menge dest. Wasser. Die Reaktion wird durch Preßsaftzugabe ausgelöst und läuft bei  $T = 37^{\circ}\text{C}$  (Wasserbad) ab.

Zur Beendigung der Reaktion (Reaktionszeit  $\leq 2$  h) versetzt man den Testansatz mit 1,0 ml 0,20 M KOH und zentrifugiert ein Aliquot 1,5 min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 3200, 12 000 Upm, entsprechend 8 000 x g). Da das Substrat laugeninstabil ist, wird unmittelbar danach die Extinktionsdifferenz gegen eine Blindprobe, die erst nach Laugenzugabe mit Enzymlösung versetzt wurde, gemessen.

- b) Analog erfolgt die Bestimmung der  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase-Aktivität für Filets von Rotbarsch und Schellfisch.

Der Testansatz enthält bei einem Gesamtvolumen von 0,50 ml:

0,10 ml p-Nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminid, 5 mM in Kaliumcitrat-Puffer, 0,50 M, pH 4,5 und 0,40 ml mit dest. Wasser verdünnten Preßsaft,

Die Reaktion wird durch Preßsaftzugabe ausgelöst und läuft bei  $T = 37^{\circ}\text{C}$  (Wasserbad) ab.

Nach maximal 30 min Reaktionszeit werden die Ansätze mit 0,50 ml 0,30 M KOH versetzt und wie unter Punkt 3a beschrieben weiterbehandelt. Die Enzymaktivitäten werden auf die aus 100 g Muskulatur gewonnene Preßsaftmenge bezogen:  $\Delta E_{405} \times h^{-1} \times (100 \text{ g Musk.})^{-1}$ .

Der Zeitbedarf für die Untersuchung von 4 - 8 Filets beträgt 3 - 4 Stunden. Einige der mit Filets von Kabeljau, Seelachs und Rotbarsch erzielten Ergebnisse sind in den Tabellen 2 - 4 aufgeführt. Naßfischfilets und aufgetaute Filets unterscheiden sich in folgenden Punkten:

- die Preßsaftausbeute ist bei seegefrosteten/aufgetauten Filets im Durchschnitt höher,
- Preßsäfte aus kühlgelagerten, hinteren Filetteilen von aufgetauten Filets haben im Mittel wesentlich größere Enzymaktivitäten als die entsprechenden Partien der Naßfischfilets,
- die Aktivitätsquotienten, d.h. das Verhältnis der Enzymaktivitäten in den Preßsäften aus laborgefrosten und kühlgelagerten Filetteilen, weisen für Naßfischfilets im Durchschnitt deutlich höhere Werte auf als für aufgetaute Filets. Allerdings überlappen sich beide Wertebereiche, so daß in Zweifelsfällen zusätzlich eine Bestimmung der Enzymaktivität im Extrakt erforderlich sein kann.

Sämtliche bisher aus den Fischgeschäften untersuchten Filets konnten mit der "Schnellmethode" jedoch zweifelsfrei klassifiziert werden.

#### LITERATUR:

- (1) CONNELL, J.J.: Control of Fish Quality. S. 59 ff., West Byfleet, London: Fishing News (Books) Ltd. 1975
- (2) ANON.: Wie verfährt der Facheinzelhandel mit Auftauware? Allg.FischwZtg 31 (1): 31, 1979

Tabelle 2: Kabeljaufilets

Filet-No.		Preßsaftausbeute (g Preßsaft / 100 g Musk.)	$\alpha$ -Glucosidase- Aktivität $A_{E_{405}} \times h^{-1} \times$ (100 g Musk.) <sup>-1</sup>	Aktivitäts- quotient (A/B)
Naßfischfilet				
1	A	27,2	47	2,5
	B	26,2	19	
2	A	23,5	59	1,9
	B	23,2	31	
3	A	27,5	92	3,4
	B	26,2	27	
4	A	22,3	41	2,7
	B	26,2	15	
Mittel	A	25,1	60	-
"	B	25,5	23	-
"	Akt. quo.	-	-	2,6
Aufgetautes Filet				
5	A	30,7	153	1,6
	B	33,3	99	
6	A	28,8	85	1,3
	B	30,7	64	
7	A	35,7	96	1,2
	B	34,6	79	
8	A	26,9	80	1,1
	B	27,8	76	
Mittel	A	30,5	104	-
"	B	31,6	80	-
"	Akt. quo.	-	-	1,3

Naßfischfilets wurden vom Fischmarkt in Hamburg-Altona bezogen.  
Die aufgetauten Filets stammen aus seegefrosteten, mit Leitungswasser aufgetauten Filetplatten.  
Die vorderen, im Labor gefrosteten Filetteile sind mit "A" bezeichnet, während sich "B" auf die zugehörigen hinteren, kühlgelagerten Filetteile bezieht.

Tabelle 3: Seelachsfilets

Filet-No.		Preßsaftausbeute (g Preßsaft/ 100 g Musk.)	$\alpha$ -Glucosidase- Aktivität $\Delta E_{405} \times h^{-1} \times$ (100 g Musk.) <sup>-1</sup>	Aktivitäts- quotient (A/B)
Naßfischfilet				
1	A	20,2	168	4,1
	B	19,5	41	
2	A	20,7	164	3,8
	B	15,2	43	
3	A	24,2	178	3,0
	B	17,5	60	
4	A	18,9	146	3,0
	B	13,1	48	
5	A	18,7	154	5,5
	B	18,5	29	
6	A	17,5	145	4,9
	B	15,6	30	
Mittel	A	20,0	159	-
"	B	16,6	42	-
"	Akt. quo.	-	-	4,1
Aufgetautes Filet				
7	A	23,3	206	1,6
	B	18,7	131	
8	A	22,6	196	1,3
	B	24,2	152	
Mittel	A	23,0	201	-
"	B	21,5	142	-
"	Akt. quo.	-	-	1,5

Naßfischfilets wurden vom Fischmarkt in Hamburg-Altona bezogen. Die aufgetauten Filets stammen aus seegefrosteten, mit Leitungswasser aufgetauten Filetplatten. Die vorderen, im Labor gefrosteten Filetteile sind mit "A" bezeichnet, während sich "B" auf die zugehörigen hinteren, kühlgelagerten Filetteile bezieht.

Tabelle 4:     Rotbarschfilets

Filet-No.		Preßsaftausbeute (g Preßsaft/ 100 g Musk.)	$\beta$ -N-Acetylglucos- amindase-Aktivität $\Delta E_{405} \times h^{-1} \times$ (100 g Musk.) <sup>-1</sup>	Aktivitäts- quotient (A/B)
Naßfischfilet				
1	A	25,4	1402	1,6
	B	20,0	900	
2	A	18,5	1493	2,0
	B	17,1	744	
3	A	22,1	1386	1,5
	B	19,4	937	
4	A	22,2	1951	2,3
	B	17,3	848	
Mittel	A	22,1	1558	-
"	B	18,5	857	-
"	Akt. quo.	-	-	1,9
Aufgetautes Filet				
5	A	28,9	2471	0,84
	B	30,4	2946	
6	A	29,2	2654	0,89
	B	30,1	2986	
7	A	29,1	2252	0,90
	B	26,7	2491	
8	A	30,5	2983	1,01
	B	29,3	2945	
Mittel	A	29,4	2590	-
"	B	29,1	2842	-
"	Akt. quo.	-	-	0,91

Naßfischfilets wurden vom Fischmarkt in Hamburg-Altona bezogen.  
 Die aufgetauten Filets stammen aus seegefrosteten, mit Leitungswasser  
 aufgetauten Filetplatten.  
 Die vorderen, im Labor gefrosteten Filetteile sind mit "A" bezeichnet,  
 während sich "B" auf die zugehörigen hinteren, kühlgelagerten Filet-  
 teile bezieht.

- (3) RAKOW, D.: Vergleichende Untersuchungen an "frischen" Fischen und an in der Luft aufgetauten "Frost"-Fischen zur Ermittlung von Qualitäts- und Haltbarkeitsunterschieden. Arch. Lebensmittelhyg. 21: 226-229, 1970
- (4) REHBEIN, H.; KRESS, G.; SCHREIBER, W.: An Enzymic Method for Differentiating Thawed and Fresh Fish Fillets. J. Sci. Fd. Agric. 29: 1076-1082, 1978

H. Rehbein  
Institut für Biochemie und Technologie  
Hamburg